

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

WEST

Generate Collection

L14: Entry 349 of 590

File: DWPI

May 27, 1997

DERWENT-ACC-NO: 1998-061518

DERWENT-WEEK: 199806

COPYRIGHT 2003 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: New bacteriophage Bacteriophagum salmonellae having anti-salmonella activity and resistance to bacteriostatics - also anti-salmonella composition containing a strain of the bacteriophage, the components of a nutrient medium and an additive

INVENTOR: ALEKSIN, L M; KUZMIN, V A ; POLYNSKII, A V

PRIORITY-DATA: 1995RU-0101400 (February 3, 1995)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
RU 2080384 C1	May 27, 1997		005	C12N007/00

INT-CL (IPC): C12 N 7/00; C12 N 7/00; C12 R 1:42



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 080 384** ⁽¹³⁾ **C1**
 (51) МПК⁶ **C 12 N 7/00//C 12 N 7/00, C 12 R 1:42)**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
 ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 95101400/13, 03.02.1995

(46) Дата публикации: 27.05.1997

(56) Ссылки: Справочник практического врача. - М.: Медицина, 1982, с. 293. Авторское свидетельство Чехословакии N 221104, кл. C 12N 7/00// C12R 1/42, 1986.

(71) Заявитель:
 Акционерное общество закрытого типа
 "Биотех",
 Алексин Лев Максимович

(72) Изобретатель: Алексин Л.М.,
 Кузьмин В.А., Полынский А.В.

(73) Патентообладатель:
 Акционерное общество закрытого типа
 "Биотех",
 Алексин Лев Максимович

(54) ШТАММ БАКТЕРИОФАГА BACTERIOPHAGUM SALMONELLAE, ОБЛАДАЮЩИЙ ПРОТИВОСАЛЬМОНЕЛЛЕЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ И УСТОЙЧИВОСТЬЮ К БАКТЕРИОСТАТИКАМ, И ПРОТИВОСАЛЬМОНЕЛЛЕЗНЫЙ ПРЕПАРАТ

(57) Реферат:

Использование: микробиология. Сущность изобретения: штамм бактериофага выделен из сточных вод С.Петербурга. Штамм Bacteriophagum salmonellae, депонированный в Коллекции Гос. НИИ ОЧБ под шифром СФ-17, обладает лизирующей активностью по отношению к сальмонеллам всех 5 групп, а

также устойчив к действию бактериостатиков, таких как метацид, ампициллин, хинозол. Препарат на основе бактериофага имеет следующий состав ингредиентов в 1 мл препарата: фэг СФ-17 - 10^8 - 10^{10} частиц, бактериостатик - 0,1-2,5 мг, аминокептид - остальное, 2 с и 4 з.п. ф-лы, 1 табл.

RU 2 080 384 C1

RU 2 080 384 C1



RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 080 384** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁶ **C 12 N 7/00//C 12 N 7/00, C**
12 R 1:42)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 95101400/13, 03.02.1995

(46) Date of publication: 27.05.1997

(71) Applicant:

Aksionernoe obshchestvo zakrytogo tipa
"Biolekh",
Aleksin Lev Maksimovich

(72) Inventor: Aleksin L.M.,
Kuz'min V.A., Polynskij A.V.

(73) Proprietor:
Aksionernoe obshchestvo zakrytogo tipa
"Biolekh",
Aleksin Lev Maksimovich

(54) **STRAIN OF BACTERIOPHAGE BACTERIOPHAGUM SALMONELLAE SHOWING ANTISALMONELLOSIS
ACTIVITY AND RESISTANCE TO BACTERIOSTATICS AND ANTISALMONELLOSIS PREPARATION**

(57) Abstract:

FIELD: microbiology. SUBSTANCE: strain is
isolated from sewage in St. -Peterburg.
Strain Bacteriophagum salmonellae is
deposited in Collection at code SF-17.
Strain shows lysing activity with respect to
salmonellae of all 5 groups, resistant to

bacteriostatics (methacide, ampicillin,
quinoxol). Bacteriophage-base preparation
has the following composition of components,
in 1 ml preparation: phage SF-17 \$\$\$
particles, bacteriostatic 0.1-2.5 mg, and
aminopeptide - the rest. EFFECT: strain
indicated above. 6 cl, 1 tbl

RU 2 080 384 C1

RU 2 080 384 C1

Изобретение относится к области микробиологии, а именно к фаговым препаратам для борьбы с сальмонеллезом.

Известно применение для борьбы с сальмонеллезом антибиотиков, химиопрепаратов, глюкокортикоидов, антигистаминных препаратов (Справочник практического врача. М. Медицина, 1982, с. 293).

Недостатком препаратов является значительное количество противопоказаний и побочных эффектов, слабая эффективность при профилактическом использовании.

Известны препараты бактериофагов сальмонелл, применяемые для профилактики и лечения (например, авт. св. СССР N 192122).

Недостатком препарата является ограниченный спектр действия (не на все виды сальмонелл), низкая концентрация фаговых частиц, дороговизна.

Прототипом настоящего изобретения является фаговый препарат, получаемый по авт. св. СССР N 221104. Препарат выращивают, используя зараженный фагом штамм сальмонелл при 37° на казеин-гидролизатной питательной среде, содержащей 3,5% казеин-гидролизата, в течение 3-5 часов, после чего смешивают с альбумином в соотношении 10:1-2 сушат до влажности 7%. Препарат используют в концентрации 1 г/л воды перорально в течение 2-3 дн при выпаивании животных. Животные выздоравливают через 48 ч. Длительность хранения препарата в жидком виде 3-4 мес.

Недостатками препарата и способов его применения является ограниченность применения: только культивируемый вид сальмонелл и, как следствие, невозможность профилактики, а также недостаточные сроки хранения препарата.

Задачей, стоявшей перед авторами, явилось создание фагового препарата, эффективного против различных видов сальмонелл, а также стабильного при хранении с различными бактериостатиками в течение длительного времени.

Задача была решена путем выделения бактериофага из сточных вод С. Петербурга и селекции его популяций выдержкой в течение 10-15 пассажей в присутствии 0,1 мг/мл метацида, 2,5 мг/мл ампициллина и 1 мг/мл хинолола.

Фаг *Bacteriophage salmonellae* был депонирован в Коллекции ГосНИИ особо чистых биопрепаратов под номером СФ-17.

Штамм обладает следующими характеристиками. На электроннограммах морфология фага: головка гексогональной формы, размер 48-50 нм, хвостовой отросток 115-120 нм. Морфология негативных колоний на бактериальном хозяине: диаметр негативных колоний 3-5 нм, центр прозрачный, край четкий, вторичный рост отсутствует.

Спектр литической активности: бактериофаг лизировал 208 штаммов сальмонелл серологических групп А, В, С, D, Е, из которых 3 штамма принадлежали к группе А, 26 штаммов к группе В, 10 штаммов к группе С₂, 21 штамма к группе С₁, 143 штамма к группе D₁, 5 штаммов к группе Е₁.

Диапазон специфичности: лизирует сальмонеллы различных серологических

групп, не лизирует дизентерийные палочки (шигеллы Зонна, Флекснера), свежесделанные и музейные штаммы кишечной палочки и другие представители нормальной микрофлоры. Не теряет активности в присутствии 1 мг/мл метацида, 2,5 мг/мл ампициллина, 1 мг/мл хинолола.

Бактериальные штаммы для поддержания и размножения сальмонеллезного бактериофага: *Salmonella enteritidis* штамм N 36. Оптимальные условия размножения бактериофага: среда аминокислот для микробиологических сред, множественность заражения (бактерия/фаг) - 1:5 1:10. Условия хранения: жидкий препарат бактериофага, приготовленный на

аминокислоте хранят при температуре 2-8 °С. Периодичность поставок 1 год. Литическая активность (титр по Грациу) 10^8 - 10^{10} бляшкообразующих единиц в 1 см³.

Способ размножения: размножается на штамме *Salmonella enteritidis* N 36 (группа D), соматический О-антиген; рецепторы 1, 9, 12, жгутиковый антиген; рецепторы g, m.

Биологическая активность: лизирует сальмонеллы групп А, В, С, D, Е безвредность проверялась на мышках при внутрикожном введении цельного препарата и на птицах при пероральном и аэрозольном применении. Препарат безвреден (LD₅₀ не достигнута).

Способ хранения: хранится в жидком и лиофильно высушенном виде при +2 - +10 °С. Срок хранения 1 г.

Для практического использования на базе нового фага был создан препарат, отличающийся высокой эффективностью при аэрозольном применении и стабильный при хранении с различными бактериостатиками, что является особо важным в условиях дефицита реагентов для микробиологических целей.

Препарат содержал на 1 мл фильтрата культурной жидкости: фаг СФ-17 - 10^8 - 10^{10} частиц, бактериостатик 0,1-2,5 мг, аминокислота - остальное.

В качестве бактериостатиков использовали ампициллин в концентрации 1-2,5 мг/мл, хинозол в концентрации 0,1-1 мг/мл, метацид в концентрации 0,2-1 мг/мл или их смеси.

Более высокие концентрации бактериостатиков снижают эффективность фага, более низкие не гарантируют отсутствие проростов.

Концентрация фага менее 10^8 частиц/мл не обеспечивает достаточной эффективности. Концентрацию фага более 10^{10} частиц/мл получить не удалось.

Фаговый препарат может использоваться как аэрозольно, так и перорально.

Оптимальными условиями использования препарата для профилактики и лечения птиц является сочетание аэрозольного и перорального способов введения.

Аэрозольная обработка осуществляется разведением препарата до содержания фага не менее 10^8 частиц на мл и обработкой в течение 20-30 мин, а пероральная добавлением препарата в питье из расчета не менее 10^6 частиц на голову птицы. Вместе с тем возможно использование одного из указанных способов в качестве самостоятельного для профилактики и

RU 2080384 C1

RU 2080384 C1

лечения сальмонеллеза птиц.

Использование препарата в больших дозах или обработка в течение более длительного времени не дает дополнительного эффекта.

Указанный штамм, композиция препарата на его основе в литературе не описан, что свидетельствует о его соответствии критерию "новизна".

Новые свойства штамма лизирование сальмонелл пяти групп при отсутствии негативного эффекта при стабильности в присутствии вышеуказанных консервантов, создание композиции, позволяющей сохранять препарат практически без потери активности в жидкой форме в течение по крайней мере 1-1,5 лет, эффективность воздействия свидетельствует о получении эффекта, позволяющего решить задачу, стоящую перед учеными, разрабатывающими методы борьбы с одним из самых серьезных и распространенных заболеваний животных и птиц сальмонеллезом, и до настоящего времени ими не достигнутого, что подтверждает наличие у данной группы изобретений соответствия критерию "изобретательский уровень".

Препарат прошел успешные испытания на ряде птицефабрик Московской и Ленинградской области.

Объединение вышеперечисленных изобретений в единую группу обусловлено их подчинению единому изобретательскому замыслу созданию методов борьбы с сальмонеллезом, а также единой основой отдельных изобретений новым штаммом бактериофага СФ-17, что сделало возможным их производство и использование. Сущность и преимущество изобретения иллюстрируются следующими примерами.

Пример 1. Получения препарата бактериофага.

3 л аминокислот для микробиологических питательных сред растворяют в 9 л воды при перемешивании до полной прозрачности. Для получения матричной раскладки фага в бутыл, содержащую аминокислотный бульон, вносят бульонную культуру сальмонелл 18-18-часового роста и бактериофаг СФ-17 из расчета 2 см³ бульонной культуры и 2-3 см³ фага на 1 л среды и выдерживают в течение 4-8 ч при 37-38°C при периодическом перемешивании до полного просветления раствора, после чего в препарат добавляют раствор метицила до концентрации 0,2-1 мг/мл, или раствор хинозола до конечной концентрации 0,1-1 мг/мл, или раствор ампицилина до 1-2,5 мг/мл. Полученный препарат выдерживают 5 сут при температуре 37-38°C для выявления возможной контаминации, фильтруют и расфасовывают по флаконам по 10 см³.

Испытание противосальмонеллезной эффективности препарата бактериофага проводили на птицефабрике производственного объединения "Синявинское" (Ленинградская область) в девятиэтажных корпусах.

Пример 2. Опыты по хранению препаратов, содержащих различные бактериостатики.

Препарат бактериофага СФ-17 с содержанием частиц 10¹⁰ с различными

количествами бактериостатиков хранился 18 месяцев при температуре +4±2°C.

Результаты сохранения активности препарата приведены в таблице.

Пример 3. Аэрозольное применение сальмонеллезного бактериофага на выводе (в выводном шкафу).

1 флакон препарата сальмонеллезного фага (10 мл препарата содержат 10 тысяч доз) разводят водой до 500 мл. Аэрозольную обработку осуществляют с помощью генератора САГ. Объем жидкости, переводимой в аэрозоль, должен составлять 5 мл (5·10⁹ частиц фага) на 1 м³ выводного шкафа. Время экспозиции 20 минут. В опыте в контроле использовали по 20,5 тысяч голов птицы в возрасте от 1 до 39 дн. При этом были получены следующие результаты в опытной партии птиц падеж составлял 0,66% в контрольной 2,84%. Таким образом, кратность увеличения выживаемости обработанных птиц составила 3 раза.

Пример 4. Пероральное применение сальмонеллезного бактериофага.

Препарат сплавляли через желобковые поилки в течение 6 суток, начиная с 1 сут в количестве 0,5 дозы на цыпленка (10⁸ частиц фага). Перед употреблением препарат разводили водой из расчета содержания 1 дозы препарата в 1 мл.

Для обработки 20 тысяч голов 1 флакон препарата разводили в 10 л воды. Возраст птицы тот же, что в примере 3. В результате пероральной обработки 20,5 тысяч голов птиц через поилки получены следующие результаты: в опытной партии падеж птиц составил 1,9% в контроле 3% а кратность увеличения выживаемости птицы в опыте составила 1,5 раза.

Пример 5. Сочетанная аэрозольно-пероральная обработка птицы проводилась в условиях обработки, указанной в примерах 3, 4. Число птиц 20 тысяч.

В результате сочетанной обработки падеж птиц составил 0,8% в контроле - 2,3% а кратность увеличения выживаемости в опыте 3,5 раза.

Таким образом, наиболее эффективным способом оказалась сочетанная аэрозольно-пероральная обработка птиц, начиная с односуточного возраста. Как показали приведенные результаты, использование препарата СФ-17 позволяет эффективно осуществлять профилактику и лечение птиц, обработку яиц и т.п. методы борьбы с сальмонеллезом.

Выпуск препарата осуществляется АО "БИОТЕХ" с 1993 года.

Формула изобретения:

1. Штамм бактериофага *Bacteriophage salmonellae* ГосНИИ особо чистых биопрепаратов НСФ-17, обладающий противосальмонеллезной активностью и устойчивостью к бактериостатикам.

2. Противосальмонеллезный препарат, содержащий бактериофаг, компоненты питательной среды и добавки, отличающийся тем, что в качестве бактериофага используют бактериофаг по п.1, в качестве компонентов питательной среды - аминокислоты, а в качестве добавок бактериостатик при следующем содержании ингредиентов в мл препарата:

Бактериофаг *Bacteriophage salmonellae*

RU 2080384 C1

RU 2080384 C1

ГосНИИ особо чистых биопрепаратов НСФ-17
10⁸ 10¹⁰ частиц

Бактериостатик 0,1 2,5 мг
Аминолепид. Остальное

3. Препарат по п. 2, отличающийся тем,
что в качестве бактериостатика используют
метацид в конечной концентрации 0,2 1 мг/мл.

4. Препарат по п. 2, отличающийся тем,
что в качестве бактериостатика используют

ампициллин в конечной концентрации 1 2,5
мг/мл.

5. Препарат по п. 2, отличающийся тем,
что в качестве бактериостатика используют
хинсозл в концентрации 0,1 1 мг/мл.

6. Препарат по п. 2, отличающийся тем,
что в качестве бактериостатика используют
смесь, содержащую по крайней мере два
вещества из группы, содержащей метацид,
хинсозл и ампициллин

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

-5-

RU 2 0 8 0 3 8 4 C 1

RU 2 0 8 0 3 8 4 C 1

Результаты сохранения активности препарата

Содержание бактериостатика, мг/мл			Сохранение активности, %
метацид	хинозол	ампициллин	
-	-	-	** -
1,0	-	-	96
0,5	-	-	90
0,2	-	-	80
-	1,0	-	93
-	0,5	-	80
-	0,1	-	70
-	-	2,5	98
-	-	1,5	92
-	-	1,0	75
1,0	0,5	-	98
0,2	0,2	1,0	100
0,5	-	1,5	98

** - без бактериостатика через 6 дн. происходит пророст бактерий,
что свидетельствует об отсутствии активности.

RU 2080384 C1

RU 2080384 C1